

⑪ 公開特許公報 (A) 平3-240725

⑤Int.Cl.⁵
A 61 K 31/35識別記号
ACV
AAN
ABL
ABN
ABX庁内整理番号
7475-4C

⑩公開 平成3年(1991)10月28日

35/78
// C 07 D 311/30

ADP Q

8412-4C
7252-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全6頁)

⑪発明の名称 メイラード反応阻害剤

⑪特 願 平2-34916

⑪出 願 平2(1990)2月15日

⑫発明者 守先 真由美 兵庫県尼崎市梶ヶ島8-6

⑫発明者 井上 淳 大阪府摂津市正雀4丁目13番57号

⑫出願人 千寿製薬株式会社 大阪府大阪市中央区平野町2丁目5番8号

明細書

1. 発明の名称

メイラード反応阻害剤

2. 特許請求の範囲

(1) 黄ごんに含まれるフラボノイドを薬理活性成分として含有することを特徴とする、メイラード反応阻害剤。

(2) 黄ごんを水と低級アルコールとの混合液に浸漬して加温して得られる抽出液より、該抽出液量の2倍以上の水を加えるか又はアルコールを気散させることにより、アルコール濃度を約25w/v%以下に低下させることによって析出して得られるエキスを薬理活性成分として含有することを特徴とする、メイラード反応阻害剤。

(3) 加温の温度が約40°C乃至60°Cでかつ、水と低級アルコールの混合液が水約20乃至30重量部に対しメタノール又はエタノール約80乃至70重量部の混合液である、特許請求の範囲第2項記載のメイラード反応阻害剤。

(4) バイカルシンを薬理活性成分として含有する

ことを特徴とするメイラード反応阻害剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はメイラード反応として知られたブドウ糖等の還元糖によるタンパク質の劣化の防止に関する、詳しくはブドウ糖がタンパク質に非酵素的に結合して生ずるアマドリ転移生成物の生成阻害剤に関する。本発明は更に詳しくは、黄ごんの特定抽出エキス又はバイカルシンを含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤に関する。

(従来の技術)

タンパク質がブドウ糖等の還元糖と非酵素的に反応(以下「グリコシル化」という。)して褐色化する反応はメイラードによって1912年に報告 [Maillard, L.C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599(1912)] されて以来、食品化学の分野においてはメイラード反応の名で広く知られてきた。すなわち、貯蔵又は加熱処理を受けた食品中でタンパク質とブドウ糖とが反応して褐色化し、ついにはタンパク質分子間に交差結合が生じることに

よりタンパク質の変成が起こることが知られていた。その後、赤血球中においてヘモグロビンの小成分である Hb_{α_1} が糖尿病患者において増加しているとのラーバーの報告 (Rabbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 295 (1968)) を機に、生体内におけるブドウ糖とタンパク質との反応が注目され、 Hb_{α_1} の構造の解析を通じて、メイラード反応が生体内においても起こっていることが確認されるに至った。

生体中でのメイラード反応の機構はブラウンリー等によって報告されている [Brownlee, M. et al., Science, 232: 1629 (1986)]。即ち、先ずブドウ糖の開環構造において存するアルデヒド基が蛋白質分子中のアミノ基と反応してシッフ塩基を形成する。このシッフ塩基は不安定であるため速やかに分子内転移反応を起こして非酵素的にアマドリ転移生成物に変換される。タンパク質が長期間体内に保持された場合、アマドリ転移生成物は徐々に脱水反応を起こして新たなブドウ糖誘導体へと変化し、これがタンパク質分子等の種々の分

するものと考えられている。

この様な背景のもとで、生体内におけるメイラード反応を阻害する物質の探索が行なわれつつあり、例えば、前記ブラウンリー等によりアミノグアニジンがインピトロ (in vitro) でメイラード反応を阻止すること及び同物質の投与が糖尿病ラットの動脈壁における AGE の生成を抑制する事を発表している。また特開昭62-142114号明細書においてアミノグアニジン、 α -ヒドラジノヒスチジン及びリジンがアマドリ転移生成物中の活性カルボニル基と反応してこれを封鎖し、AGE 生成を阻害することが示唆されており、特開昭64-56614号明細書において、例えばチオセミカルバジド類、1、3-ジアミノグアニジン、ベンゾイルヒドラジン等、及び特開昭64-83059号明細書において各種グアニジン誘導体がメイラード反応を抑制することが開示されている。

(発明が解決しようとする課題)

上記各特開昭明細書においては、メイラード反

子と不可逆的に交差結合して架橋を形成することにより、主としてタンパク質の重合体を形成する。

このような進行したグリコシル化生成物は通常 AGE (Advanced Glycosylation End product) と略称されるが、AGE の生成に伴い、タンパク質の生物学的適応性が減弱し溶解度が低下し、プロテアーゼの作用を受け難くなり、多くは黄褐色化し蛍光を発するに至る。

メイラード反応は健常人においても認められる現象であるが、血糖上昇を特徴とする糖尿病に特に顕著に認められる。また、メイラード反応は代謝回転の比較的緩徐なタンパク質において顕著であり、例えばコラーゲンや水晶体の構造タンパク質であるクリスタリン等において特に著しい。また、糖尿病においては神経障害、白内障、腎障害、網膜症、関節硬化症、アテローム性動脈硬化症等種々の合併症が認められるが、これら糖尿病合併症は老年期に多い疾病と酷似しており、正常な血糖値にあっても、ブドウ糖が代謝回転の緩徐なタンパク質をグリコシル化して徐々に AGE を形成

するものと考えられている。

この様な背景のもとで、生体内におけるメイラード反応を阻害する物質の探索が行なわれつつあり、例えば、前記ブラウンリー等によりアミノグアニジンがインピトロ (in vitro) でメイラード反応を阻止すること及び同物質の投与が糖尿病ラットの動脈壁における AGE の生成を抑制する事を発表している。また特開昭62-142114号明細書においてアミノグアニジン、 α -ヒドラジノヒスチジン及びリジンがアマドリ転移生成物中の活性カルボニル基と反応してこれを封鎖し、AGE 生成を阻害することが示唆されており、特開昭64-56614号明細書において、例えばチオセミカルバジド類、1、3-ジアミノグアニジン、ベンゾイルヒドラジン等、及び特開昭64-83059号明細書において各種グアニジン誘導体がメイラード反応を抑制することが開示されている。

(発明が解決しようとする課題)

上記各特開昭明細書においては、メイラード反応の最終生成物である AGE の生成量を指標としてメイラード反応の阻害剤の検討を行なっているが、本発明者はメイラード反応におけるタンパク質の重合の段階における直接的原因物質であるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害することにより極めて効果的なメイラード反応の阻害が期待できるとの観点から、アマドリ転移生成物の生成阻害作用の有無及び強さを実験上の指標とした。

タンパク質のリジン残基の ϵ -アミノ基の非酵素的グリコシル化によって生成するアマドリ転移生成物である ϵ -N-(furanyl-methyl)-L-lysine (以下「フロシン」という。) の測定値をタンパク質の非酵素的グリコシル化の指標となし得ることは、 Bruggeann 等 [J. Bruggeann et al., Lebense. Unters. Porsch., 137: p. 137-143 (1968)] および Finot 等 [P.A. Finot et al., Experientia, 24: p. 1097-1099 (1968)] によって報告されている。本発明者はブドウ糖含有タンパク質水溶液を用いてフロシンを生成させることを試み、適当な生成条件を求めて検討を重ね、それにより

確立した条件に従って種々の物質のフロシン生成阻害効果の有無および強さについて検討した。その結果本発明者は、黄ごん (*Scutellariae Radix*) より水アルコール混合液等により加温下容易に抽出して得られるエキスに強いフロシン生成阻害効果があることを見いだし、更に検討を重ねて本発明を完成するに至った。

（問題点を解決するための手段）

すなわち、本発明は、黄ごんに含まれるフラボノイドを薬理活性成分として含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤であり、また、黄ごんを水アルコール混合液に加温しながら浸漬することにより得られる抽出液に水を加えて析出させて採取することのできる、水に難溶性の析出物よりなるエキス（以下「エキスA」という。）を薬理活性成分として含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤であり、更に、黄ごんに含有されるフラボノイドの一つであるバイカリンを含有する事を特徴とするメイラード反応阻害剤である。

黄ごんはコバネバナ [*Scutellaria*

はこれに含有される各成分についてのメイラード反応阻害作用に関する報告は未だなく、本発明者らの研究によって初めて明らかにされたものである。

黄ごんに含まれるフラボノイドは、黄ごんを例えれば水、アルコールまたはこれらの混合液に浸漬し加熱することにより、バイカリン、バイカレイン、オウゴニンの他多數の成分を含む抽出物として得ることができる。

黄ごんよりエキスAを得るには、例えば黄ごん末に精製水を加えて2乃至3時間40乃至60℃に加温して前処理した後、エタノール又はメタノール等の低級アルコールを加えてアルコール濃度を約70～80w/v%として加温下に更に浸漬し、加温下に通過して、場合により更に滤液にセルロースを加えて再度通過し、滤液に水を加えるか又はアルコールを減圧留去等により除くことにより、アルコール濃度を約25w/v%以下として放置し析出する結晶を滤取、乾燥することによって得ることができる。エキスAは主としてバイ

baicalensis Gorgi (Labiatae)] の周皮を除いた根であり、黄ごん湯、黄連解毒湯、小柴胡湯、大柴胡湯その他多數の処方に配合されており、漢方薬において重用されている生薬である。黄ごんには、バイカリン、バイカレイン、オウゴニンその他のフラボノイドが含有されることが知られている。黄ごんに含まれる成分の薬理作用としては、黄ごんのエタノールエキス、バイカリン (*baicalin*) 及びバイカレイン (*baicalein*) に胆汁排泄促進作用、利尿作用、緩下作用、抗アレルギー作用が、メタノールエキスに抗炎症作用及び解熱作用が、エーテルエキスには抗菌作用が、バイカリン及びバイカレインに網細血管透過性抑制作用、抗アセチルコリン作用、抗アナフィラキシー作用、実験的喘息抑制作用、バイカリンには肝障害による血清GOT、GPT値上昇抑制作用、フラボノイド成分に肝コレステロール、遊離脂肪酸、トリグリセリド低下作用等が既に知られている（以上第11改正日本薬局方解説書、D-115、1986年）。しかしながら、黄ごんの抽出エキス又

カレインを含有し、他に少量のオウゴニンおよび微量のバイカリンその他の塩化第二鉄メタノールによる液呈色反応陽性の物質を含有する。

本発明のメイラード反応阻害剤はメイラード反応を原因として生ずると考えられる前述の諸疾患の治療又は予防に用いることができる。

当該目的に供する場合、本発明のメイラード反応阻害剤は経口的に又は非経口的に投与することができる。また、非経口的投与の場合には例えれば点眼剤等として局所的に投与することもできる。

本発明のメイラード反応阻害剤の投与量は、経口投与においては通常、1日量1mg～1000mgの範囲、より好ましくは1日量5mg～200mgの範囲で、また点眼液剤としての投与においては通常、0.05w/v%～5w/v%の範囲、より好ましくは0.1w/v%～2.0w/v%の範囲の水性の液として、投与を行なうことができる。ただし、投与量はこれらの記載によって必ずしも限定されるものではなく、疾患の種類、重篤度及び治療計画等により適宜設定され得る。

本発明のメイラード反応阻害剤は、経口投与のための例えば錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤若しくはカプセル剤等また点眼のための例えば点眼液剤、もしくは点眼軟膏剤等の適宜の形態にすることができる。

本発明のメイラード反応阻害剤を経口投与用錠剤の形態とするには、例えばヒドロキシプロビルセルロース、結晶セルロース、コーンスター、ポリビニルピロリドン、メタ硅酸アルミニウムマグネシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑潤剤、纖維素グルコン酸カルシウム等の崩壊剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸等の溶解補助剤その他錠剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。また本発明のメイラード反応阻害剤を点眼剤の形態とするには、例えば、リン酸塩、ほう酸塩、酢酸塩、クエン酸塩又はグルタミン酸等の緩衝剤、クロロブタノール、クロルヘキシジンジグルコネート、メチルパラベン、プロピルパラベンまたは塩化ベンザルコニウム等の保存剤、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、

バイカリン、バイカレイン及びオウゴニンは市販のもの（米山薬品工業）を使用し、エキスAは以下の方法によって調整して使用した。

エキスAの調製

黄ごん末10gに精製水60mlを加え、50℃にて3時間の浸漬により前処理した後、浸漬液にエタノール180mlを加えて、50℃にて更に1時間浸漬することにより抽出を行い、毎時滤過して滤液を得る。加温下に該滤液にセルロース約30gを添加して攪拌した後滤過し、滤液に滤液の液量の約2倍量相当するの精製水を加え、4℃に冷却して放置し、析出物を滤取し乾燥して、エキスAとして黄色結晶0.55gを得た。

エキスAの組成

上記抽出によって得られたエキスAは、薄層クロマトグラフィー（シリカゲル Art 5715：メルク社製）上、n-ブタノール：酢酸：水（40:10:50）の混合液による展開後、塩化第二鉄メタノール液（1w/v%溶液）の噴霧による呈色反応で、標品であるバイカレイン（Rf

チオ硫酸ナトリウム又はエデト酸二ナトリウム等の安定化剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム及びグリセリン、マンニトール、ソルビトール等の等強化剤、又はポリソルベート80、シクロデキストリン等の溶解補助剤、その他点眼剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。

（作用）

本発明のメイラード反応阻害剤は、メイラード反応におけるタンパク質分子間架構形成の直接の原因物質たるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害するので、種々の糖尿病合併症、例えば冠動脈性心疾患、末梢循環障害、脳血管障害、神経症、腎症、動脈硬化、関節硬化症、白内障及び網膜症又は老化により引き起こされる同種の疾患例はアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、脳血管障害、老人性白内障等の治療又は予防に用いられる。

（実験例）

本発明のメイラード反応阻害剤の効果は下記の通りの実験により確認した。

値：0.85）に対応する位置（Rf値：0.82）に強い呈色反応が、標品であるオウゴニン（Rf値：0.88）に対応する位置（Rf値：0.88）に中等度の呈色反応が、標品であるバイカリン（Rf値：0.35）に対応する位置（Rf値：0.35）に微弱な呈色反応が、並びにRf値0.28およびRf値0.43にそれぞれ微弱な呈色反応がみられた。また同一試料、同一条件による展開についての50%硫酸噴霧による呈色反応によっても同様の結果が得られた。これらの結果から、エキスAはバイカレインを主成分とし、他にオウゴニンと微量のバイカリンその他少なくとも2種のラボノイドと推定されるフェノール性水酸基保有物質を含有する。

（実験方法）

牛血清アルブミン（No. A-8022：シグマ社）（以下「BSA」と略記する。）及びpH7.3の50mMリン酸緩衝液及び表1に示す各試験試料及びアミノグアニジンを用いて下記の通りのサンプル溶液を無菌的に調製し、37℃で4週間保存

し、非酵素的グリコシル化の進行に伴って生成するフロシンを Schleicher 等の方法 [E. Schleicher et al., J. Clin. Biochem., 19: p. 81-87 (1981)] に準じて高速液体クロマトグラフィーにより定量した。すなわち、反応後のサンプルを透析後、各 1 ml を凍結乾燥し、6 N 塩酸 1 ml を加えて 100 ℃で 20 時間加水分解を行い、塩酸を留去した後、水 1 ml を加えて 0.45 μm のフィルターにて通過し、高速液体クロマトグラフィー用の試料とした。カラムには ODS-120 T (東ソー) を、溶離液には 7 mM のリン酸溶液を用い、検出波長 280 nm 及び 254 nm にての吸収ピークの比が 3.9:1 であるピークをフロシンのピークとした。

(リン酸緩衝液中の組成)

(正常群) : BSA 20 mg/ml

(対照群) : BSA 20 mg/ml + ブドウ糖 50 mM

(被験群) : BSA 20 mg/ml + ブドウ糖 50 mM + 試料

| | |
|----------|------|
| バイカリン | 31.2 |
| アミノグアニジン | 8.0 |

【実施例】

本発明のメイラード反応阻害剤の製剤実施例を示す。

(実施例 1) 内服錠

下記成分を 1 錠分として常法により製造する。
必要に応じ被衣を施す。

| | |
|--------------|-------|
| エキス A | 50 mg |
| 乳糖 | 80 mg |
| コーンスター | 17 mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 3 mg |

(実施例 2) 内服錠

下記成分を 1 錠分として常法により製造する。

試料濃度: エキス A: 2 mg/ml

バイカリン: 5 mM

アミノグアニジン: 5 mM

各群のサンプルのフロシン定量結果より、次の式を用いて各被験物質のフロシン生成阻害率を算出した。

$$\text{阻害率} (\%) = \frac{(c - d)}{(c - n)} \times 100$$

但し、c: 対照群のフロシンのピーク面積

d: 被験群のフロシンのピーク面積

n: 正常群のフロシンのピーク面積

(結果)

次の表 1 に示すとおり、エキス A およびバイカリンにはメイラード反応の公知の阻害剤たるアミノグアニジンに較べてそれぞれ著しく強い阻害効果が認められた。

表 1

| 被験物質 | 阻害率 (%) |
|-------|---------|
| エキス A | 53.4 |

必要に応じ被衣を施す。

| | |
|---------------|--------|
| バイカリン | 100 mg |
| コーンスター | 90 mg |
| 乳糖 | 30 mg |
| ヒトロキシプロピセルロース | 25 mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 5 mg |

(実施例 3) カプセル剤

下記成分を常法に従って混和し、顆粒状としたものをカプセルに各 1 個 100 mg 充填する。

| | |
|--------------|--------|
| エキス A | 10 mg |
| コーンスター | 45 mg |
| 乳糖 | 20 mg |
| 結晶セルロース | 24 mg |
| タルク | 0.5 mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 0.5 mg |

(実施例 4) 点眼剤

下記の成分を常法により混合攪拌して懸濁液とし、加熱滅菌の後容器に無菌充填して製する。

| | |
|-------------|-------|
| エキス A | 0.1 g |
| リン酸二水素ナトリウム | 0.1 g |

| | | | |
|---------------|---------------|----------|----------------|
| 塩化ナトリウム | 0.7 g | 1 N NaOH | 適量 |
| エデト酸二ナトリウム | 0.02 g | 滅菌精製水 | 適量 |
| クロロブタノール | 0.2 g | 全量 | pH 6.5 100 ml |
| ポリソルベート80 | 0.2 g | | |
| ポリビニルピロリドンK30 | 0.15 g | | 特許出願人 千寿製薬株式会社 |
| 亜硫酸ナトリウム | 0.2 g | | |
| 1 N NaOH | 適量 | | |
| 滅菌精製水 | 適量 | | |
| 全量 | pH 6.5 100 mg | | |

(実施例5) 点眼剤

下記成分を常法により混合して溶液とし、無菌通過して容器に充填して点眼剤とする。

| | |
|-----------|--------|
| バイカルン | 0.3 g |
| 塩化ナトリウム | 0.3 g |
| マンニトール | 0.2 g |
| 酢酸ナトリウム | 0.2 g |
| エデト酸ナトリウム | 0.02 g |
| ポリソルベート80 | 0.1 g |
| クロロブタノール | 0.2 g |
| 亜硫酸ナトリウム | 0.2 g |

L34: Entry 10 of 11

File: DWPI

Oct 28, 1991

DERWENT-ACC-NO: 1991-358398

DERWENT-WEEK: 199149

COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Maillard reaction inhibitors contg. flavonoid(s) - from Scutellariae radix or baicalein, useful in treating diabetes and age-related diseases, e.g. coronary heart disease, etc.

PATENT-ASSIGNEE:

| | |
|----------------|------|
| ASSIGNEE | CODE |
| SENJU PHARM CO | SENP |

PRIORITY-DATA: 1990JP-0034916 (February 15, 1990)**PATENT-FAMILY:**

| PUB-NO | PUB-DATE | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC |
|---------------|------------------|----------|-------|----------|
| JP 03240725 A | October 28, 1991 | | 000 | |

APPLICATION-DATA:

| PUB-NO | APPL-DATE | APPL-NO | DESCRIPTOR |
|--------------|-------------------|----------------|------------|
| JP 03240725A | February 15, 1990 | 1990JP-0034916 | |

INT-CL (IPC): A61K 31/35; A61K 35/78; C07D 311/30**ABSTRACTED-PUB-NO:** JP 03240725A**BASIC-ABSTRACT:**

Maillard reaction inhibitors contain flavonoids from Scutellariae radix or baicalein.

Specifically the drug is prep'd. by immersion of Scutellariae radix in a mixt. of water and (m)ethanol at a rate of 20-30 pts. wt. to 70-80 pts. wt., heating at 40-60 deg.C and sedimentation by reducing the concn. of alcohol to below 25 w/v%.

USE/ADVANTAGE - Used for treatment and prevention of diabetes-associated complications and age-related diseases such as coronary heart diseases, cerebrovascular diseases and cataract.

In an example, a tablet comprises 100 mg. of baicalein, 90 mg. of corn starch, 30 mg. of lactose, 25 mg. of hydroxypropyl cellulose and 5 mg. of Mg stearate.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: MAILLARD REACT INHIBIT CONTAIN FLAVONOID RADIX BAICALEIN USEFUL TREAT DIABETES AGE RELATED DISEASE CORONARY HEART DISEASE

DERWENT-CLASS: A96 B02**CPI-CODES:** A12-V01; B06-A01; B12-F01; B12-H05; B12-L04;**CHEMICAL-CODES:**

Chemical Indexing M2 *01*
Fragmentation Code
D013 D024 D120 G010 G100 H4 H403 H443 H8 J5
J521 M1 M113 M280 M320 M412 M511 M520 M531 M540
M781 M903 M904 P448 P520 P522 P922 R038
Specfic Compounds
07938U

POLYMER-MULTIPUNCH-CODES-AND-KEY-SERIALS:

Key Serials: 0231 3201 1989 2766

Multipunch Codes: 014 04- 231 240 252 259 525 55& 645

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1991-154595

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.